

# Ispitivanje uticaja biocida i atrazina na bakterije roda *Azotobacter* izolovane iz zemljišta u okolini Istraživačke stanice Petnica

---

*Azotobacter sp.* je izolovan iz zemljišta sa četiri lokaliteta u blizini Istraživačke stanice Petnica. Izolacija je vršena korišćenjem soil-plate enrichment metode. Tečne kulture *Azotobacter sp.* tretirane su biocidima (benzalkonijum hlorid, hlorheksidin glukonat, triklosan) i atrazinom. Nakon 12 h spektrofotometrijski je određivana apsorbanca uzoraka na talasnoj dužini 600 nm, na osnovu koje je procenjen rast bakterijskih kultura. Utvrđena je osetljivost bakterijskih kultura na sve biocide korišćene u istraživanju. Kulture izolata iz zemljišta pod najmanjim antropogenim uticajem pokazale su najveću osetljivost na korišćene agense. Testirani sojevi su manje osetljivi na atrazin u odnosu na biocide.

---

## Uvod

Elementarni azot je ključni faktor za biosintezu nukleotida i aminokiselina (Postgate 1998). Atmosferu čini 78% azota u gasovitom stanju. U tom obliku biljke ne mogu da ga koriste zbog nemogućnosti redukcije (Petković *et al.* 2005). Biološka fiksacija azota vrši se uglavnom preko azotofiksatora (Milošević 1972). Najaktivniji slobodni azotofiksatori su aerobne bakterije iz familije Azotobacteraceae, koje igraju važnu ulogu u ciklusu kruženja azota (Konjević *et al.* 2006). *Azotobacter* je rod aerobnih, heterotrofnih, gram-negativnih, slobodnoživećih bakterija, koje imaju sposobnost da vezuju atmosferski azot pomoću enzima nitrogenaze, koja postoji u više formi (Howard i Rees 2006). *Azotobacter sp.* može i da sintetiše pojedine biološki aktivne supstance. Određeni

sojevi sintetišu biljne hormone, na primer auksin i time doprinese rastu biljaka (Ahmad *et al.* 2005).

Smanjene koncentracije azota u zemljištu mogu biti znak smanjenja broja azotofiksatora, koje može nastati taloženjem različitih biocida, herbicida i pesticida u zemljištu (Chen *et al.* 1995). Biocidi su neorganski ili organski molekuli koji se koriste za dezinfekciju, sanaciju ili sterilizaciju objekata i površina i očuvanje materijala od procesa mikrobiološke degradacije (Chapman 2003). Aktivnost biocida u velikoj meri varira u zavisnosti od prirode mikroorganizama, a takođe se može razlikovati između različitih sojeva iste vrste. Mogu se razlikovati tri nivoa interakcije biocida sa ćelijom – interakcija sa bakterijskim zidom, interakcija sa ćelijskom membranom i interakcija sa konstituentima citoplazme (Maillard 2002).

Cilj ovog istraživanja bio je utvrđivanje efekata triklosana, benzalkonijum hlorida, hlorheksidin glukonata i atrazina na bakterije roda *Azotobacter*.

## Korišćeni agensi

U ovom istraživanju korišćeni su biocidi koji su široko rasprostranjeni u sredstvima za ličnu higijenu: triklosan (5-hloro-2-(2,4-dihlorofenoksi)-fenol), benzalkonijum hlorid, hlorheksidin glukonat.

Istraživanja pokazuju da je triklosan detektovan u kanalizacionim izlivima i mulju zbog nepotpunog uklanjanja tokom prečišćavanja otpadnih voda (Halden i Paul 2006). Liposolubilna je, pa samim tim lako prolazi kroz ćelijsku membranu (*ibid.*). Triklosan inhibira aktivnost specifičnih enzima koji su brojnim bakterijama i gljivama neophodni za opstanak (McMurry *et al.* 1998; Levy *et al.* 1999).

---

Milica Moskovljević (1993), Beograd, Braće Baruh 20b/15, učenica 3. razreda Prve beogradske gimnazije

MENTORI:  
Marjan Biočanin, student I godine Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Jelena Savić, dipl. biolog, XII beogradska gimnazija

Benzalkonijum hlorid je hidrosolubilni antimikrobni agens koji se koristi za dezinfekciju i konzervaciju farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda. U zemljištu benzalkonijum hlorid ima visok afinitet prema humusnim materijama (Beveridge *et al.* 1998). Rastvori benzalkonijum hlorida su brzoreagujući biocidni agensi sa umereno dugotrajnim delovanjem. Aktivni su protiv bakterija, nekih virusa, gljiva i protozoa (Frühling *et al.* 2001). Na bakterije mogu delovati bakteriostatski ili baktericidno u zavisnosti od korišćene koncentracije. Gram pozitivne bakterije su osetljivije na benzalkonijum hlorid od Gram negativnih bakterija (Mc Cay *et al.* 2009).

Hlorheksidin glukonat je hemijski antiseptik. Delotvoran je i na Gram pozitivne i na Gram negativne bakterije. Koristi se u sredstvima za higijenu, kao što su sredstva za ispiranje usta i rastvori za održavanje kontaktnih sočiva (World Health Organization 1998). Takođe, utvrđeno je da hlorheksidin glukonat i benzalkonijum hlorid menjaju hidrofobnost gram-negativne bakterijske ćelije (Jones *et al.* 1991).

Atrazin je široko rasprostranjeni herbicid iz grupe hlor-s-triazina (2-hlor-4-etilamino-6-izopropilamino-s-triazin) koji se koristi protiv korova u visokim usevima (Šunjka 2012).

## Materijal i metode

U okolini Istraživačke stanice Petnica uzorkovano je zemljište sa dubine od 15 cm. Uzorkovanje je vršeno na sledećim lokalitetima (slika 1): njiva koja se nalazi u neposrednoj blizini Istraživačke stanice Petnica (lokalitet 1), okolina Petničkog jezera (lokalitet 2), njiva udaljena oko 1.5 km od Istraživačke stanice Petnica (lokalitet 3) i šuma pored Istraživačke stanice Petnica (lokalitet 4). U razgovoru sa vlasnicima obradivih površina utvrđeno je da su tokom vegetacione sezone primenjeni pesticidi, uključujući i atrazin. Zemljište iz šume korišćeno je kao kontrolni uzorak zbog pretpostavke da nije tretirano antimikrobnim agensima i da je antropogeni uticaj bio minimalan.

Za izolaciju *Azotobacter* sp. korišćena je soil-plate enrichment metoda (Becking 2006). Metoda se zasniva na obogaćivanju uzoraka zemljišta različitim hranljivim materijama, između ostalog solima molibdena, koje podstiču azotofiksaciju (Winogradsky 1938). Uzorci zemljišta su postavljeni u petri šolje sa sterilnim filter papirom i inkubirani na 27°C u trajanju od 96 sati. Na površini svih uzoraka formiran je sluzav sloj koji predstavlja azotofiksatore. Dalji po-



Slika 1. Mapa sa označenim lokalitetima sa kojih je vršeno uzorkovanje zemljišta (preuzeto sa <http://maps.google.com>)

Figure 1. Map with marked soil sampling localities (bases taken from <http://maps.google.com>)

stupak izolacije *Azotobacter* sp. zasniva se na prenošenju određene količine uzorka na selektivnu hranljivu podlogu koja sadrži 20.0 g/L glukoze, 0.8 g/L  $K_2HPO_4$ , 0.2 g/L  $KH_2PO_4$ , 0.5 g/L  $MgSO_4 \times 7H_2O$ , 0.1 g/L  $FeCl_3 \times 6H_2O$ , 0.05 g/L  $CaCl_2 \times 2H_2O$ , 0.05 g/L  $NaMoO_4 \times 2H_2O$ , 20.0 g/L agara i inkubiranju na 27°C (Becking 2006). Nakon 72 h kulture su prenete u LB tečni medijum i inkubirane na 27°C u trajanju od 12 h.

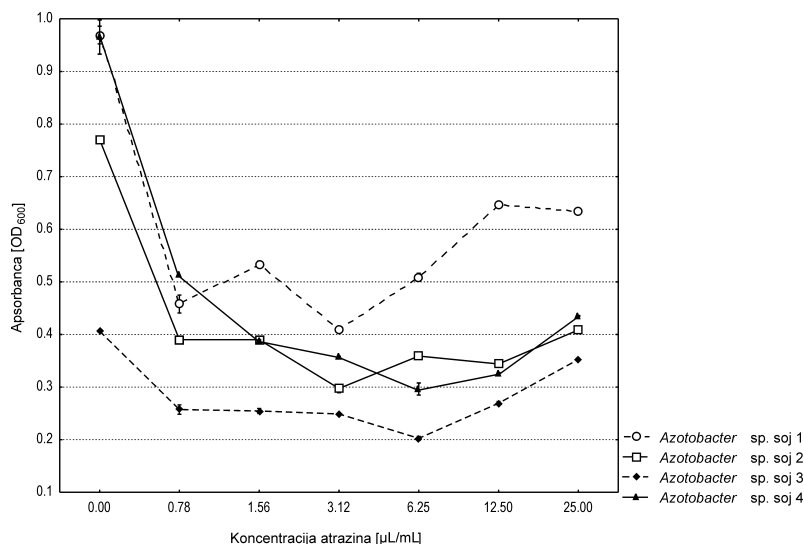
Triklosan i atrazin su rastvoreni u acetonu, dok su benzalkonijum hlorid i hlorheksidin glukonat rastvoreni u sterilnoj destilovanoj vodi. Korišćena je metoda razblaženja u seriji od šest koncentracija pri čemu je početna koncentracija 25  $\mu L/mL$  rastvora. Svaki naredni rastvor ima dva puta nižu koncentraciju od prethodnog. Najniža koncentracija pri kojoj je vršeno istraživanje je 0.78  $\mu L/mL$  rastvora. U tako napravljenoj seriji razblaženja u epruvete je dodato po 0.5 mL prekoćne kulture bakterija. Uzorci su preko noći inkubirani na temperaturi od 22°C. Nakon inkubacije je određivana apsorbancija uzoraka na talasnoj dužini od 600 nm na spektrofotometru (Cecil CE 2010), na osnovu koje je procenjen rast bakterijskih kultura. Merenje apsorbance je za svaki uzorak izvršeno u 3 ponavljanja. Radi utvrđivanja pojedinačnog dejstva biocida i atrazina na *Azotobacter* sp. urađena je i kontrola rastvarača. Biohemijska karakterizacija za rod *Azotobacter* urađena je na Simons citratnom agru, Kliglerovom dvostrukom agaru i endoagaru (Knežević i Simić 2006).

## Rezultati i diskusija

Promene apsorbanci suspenzija bakterijskih kultura izazvane dejstvom agenasa korišćenih u istraživanju prikazane su na slikama 2–5. Na osnovu apsorbanci, može se zapaziti da je atrazin, u svim koncentracijama, uticao na smanjenje rasta bakterijskih kultura (slika 2). Dobijeni rezultati ukazuju na potencijalno razvijenu rezistentnost na atrazin onih sojeva izolovanih iz uzoraka zemljišta prethodno tretiranih ovim herbicidom (lokaliteti 1, 2 i 3). Kod bakterij-

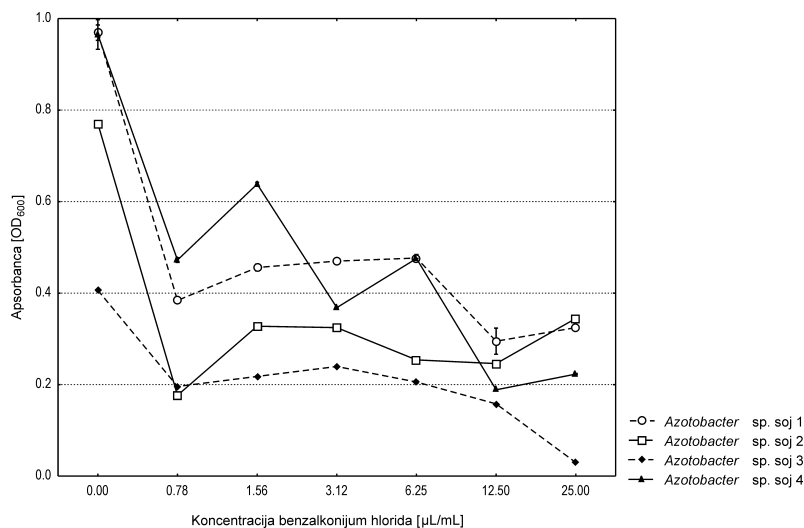
skih kultura izolovanih iz šume zabeležen je najveći pad apsorbance suspenzija bakterijskih kultura, što ukazuje na negativan efekat atrazina na *Azotobacter* sp. iz netretiranog zemljišta (lokalitet 4). Najmanja osetljivost na dejstvo atrazina uočava se kod bakterijskih kultura izolovanih iz zemljišta sa lokaliteta 3, što je zaključeno na osnovu najmanje razlike između apsorbanci suspenzija pre i nakon dejstva atrazina.

Rezultati istraživanja pokazuju da i benzalkonijum hlorid ima izraženo dejstvo na bakterijske kulture (slika 3). Pri koncentraciji od 25  $\mu\text{L/mL}$  najizraženije



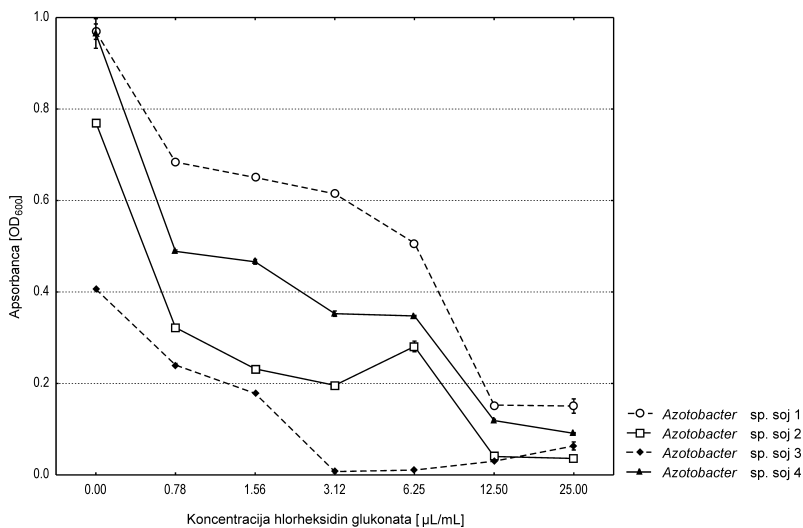
Slika 2. Efekat atrazina na izolovane kulture *Azotobacter* sp.

Figure 2.  
Atrazine effect on isolated *Azotobacter* sp. cultures



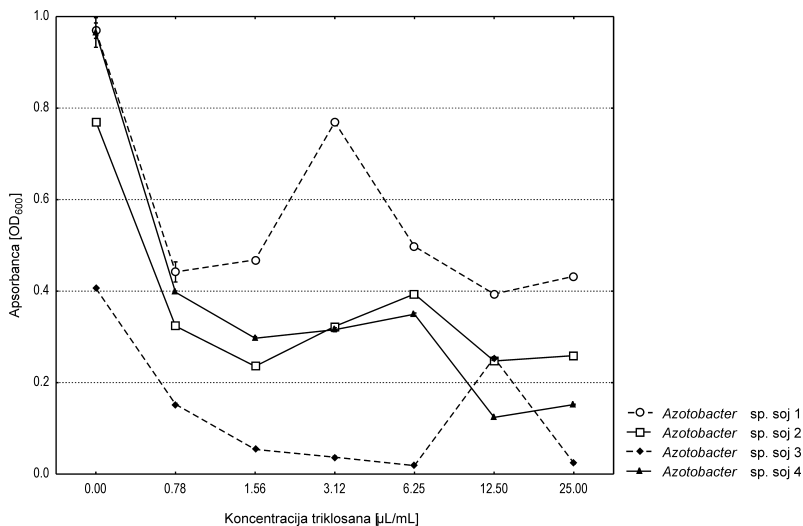
Slika 3. Efekat benzalkonijum hlorida na izolovane kulture *Azotobacter* sp.

Figure 3.  
Benzalkonium chloride effect on isolated *Azotobacter* sp. cultures



Slika 4. Efekat hlorheksidin glukonata na izolovane kulture *Azotobacter* sp.

Figure 4. Chlorhexidine gluconate effect on isolated *Azotobacter* sp. cultures



Slika 5. Efekat triklosana na izolovane kulture *Azotobacter* sp.

Figure 5. Triclosan effect on isolated *Azotobacter* sp. cultures

dejstvo benzalkonijum hlorid ispoljava na soj izolovan iz šumskog zemljišta. Apsorbanca suspenzija bakterijskih izolovanih sa ostalih lokaliteta tretiranih koncentracijom od 25 µL/mL rastvora benzalkonijum hlorida takođe je znatno je snižena u odnosu na kontrolne vrednosti.

Dejstvo hlorheksidin glukonata na bakterijske kulture je najizraženije u poređenju sa ostalim testiranim agensima (slika 4). Bakterijski sojevi izolovani iz šumskog zemljišta (lokalitet 4) imaju nižu apsorbanu pri svim primenjenim koncentracijama u odnosu na bakterijske kulture uzorkovane iz zemljišta sa lo-

kaliteta 1 iako im je početna vrednost apsorbanca bila približno ista. Ovo se može objasniti manjom osetljivošću sojeva izolovanih iz zemljišta sa njive od sojeva izolovanih sa zemljišta iz šume na dejstvo ovog biocida.

Rezultati istraživanja pokazuju izražen efekat triklosana primenjenog u visokim koncentracijama (25 µL/mL i 12.5 µL/mL) na rast kultura *Azotobacter* sp. Regős and Hitz (1974), su uočili da pri malim bakteriostatskim koncentracijama triklosan sprečava unos aminokiselina, uracila i drugih nutrijenata, ali i da pri višim baktericidnim koncentracijama triklosan iza-

ziva leziju membrane koja dovodi do curenja intracelularnih komponenti, što dovodi do ćelijske smrti. Takođe, rezultati istraživanja pokazuju da bakterijske kulture iz zemljišta sa lokaliteta 4 na tretman triklosanom reaguju najvećim sniženjem apsorbanca u odnosu na kontrolnu vrednost u poređenju sa uzorcima iz ostalih zemljišta (slika 5).

## Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su svi korišćeni agensi imali inhibicioni efekat na rast sojeva *Azotobacter* sp. Atrazin je imao izraženije dejstvo na populacije bakterija izolovane iz šumskog zemljišta. Uzrok tome je prethodna adaptiranost populacija iz agroekosistema, usled korišćenja atrazina.

Testirani sojevi koji su pokazali manju osetljivost mogli bi biti korišćeni u daljim istraživanjima u bioremedijaciji zemljišta, posebno onih zagađenih hlorksidin glukonatom.

## Literatura

- Ahmad F., Ahmad I., Khan M. S. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology*, **29**: 29.
- Becking J. H. 2006. The family Azotobacteraceae. *Prokaryotes*, 6: 759.
- Beveridge CM, Parr ACS, Smith MJ, Kerr A, Cowling MJ, Hodgkiess T. 1998. *Environ. Pollution*, **103**: 31.
- Chapman J. S. 2003. Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **51**: 133.
- Chen J. H., Czajka D. R., Lion L. W., Shuler M. L., Ghiorse W. C. 1995. Trace metal mobilization in soil by bacterial polymers. *Environmental Health Perspectives*, **103** (1): 53..
- Frühling W., Rönnpapel K., Ahlf W. 2001. Effect of zinc and benzalkonium chloride on *Nitrosomonas communis* and potential nitrification in soil. *Environmental Toxicology*, 16 (5): 439.
- Halden, R.U., Paul, D.H. 2005. Co-occurrence of triclocarban and triclosan in U. S. water resources. *Environmental Science and Technology*, **39**: 1420.
- Howard J. B., Rees D. C. 2006. How many metals does it take to fix N<sub>2</sub>? A mechanistic overview of biological nitrogen fixation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103** (46): 17088.
- Jones D. S., Gorman S. P., McCafferty D. F., Woolfson A. D. 1991. The effects of three non-antibiotic antimicrobial agents on the surface hydrophobicity of certain micro-organisms evaluated by different methods. *Journal of Applied Bacteriology*, **71**: 218.
- Knežević J., Simić D. 2006. *Metode u mikrobiologiji*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu
- Konjević R., Cvijić G., Đorđević J, Nedeljković N., 2006. *Biologija za III razred gimnazije prirodno matematičkog smera*. Beograd: Zavod za izdavanje udžbenika i nastavna sredstva
- Levy C. W., Roujeinikova A., Sedelnikova S., Baker P. J., Stuitje A.R., Rice D., Rafferty J. B., 1999. Molecular basis of triclosan activity. *Nature*, **398**: 383.
- Maillard J. Y. 2002. Antibiotic and biocide resistance in bacteria. *Journal of Applied Medicine*, **92**: 16.
- Mc Cay, P. H.; Ocampo-Sosa, A. A.; Fleming, G. T. A. 2009. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. *Microbiology*, **156** (1): 30.
- McMurry, L.M., Oethinger, M., Levy, S.B., 1998. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature*, 394: 531.
- Milošević R. 1972. Experimental study of the effects of foliage extracts of some ligneous plants on the occurrence of *Azotobacter* sp. *Ekologija*, **7** (1-2): 131.
- Petković B., Merkulov Lj., Duletić-Laušević S. 2005. *Anatomija biljaka sa praktikumom*. Beograd: NNK International
- Postgate J. 1998. *Nitrogen Fixation*. Cambridge University Pres
- Russell A. D. 1999. Factors influencing the activity of antimicrobial agents. U *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, 3rd edn.* (ur. A. D. Russell et al.). Oxford: Blackwell Scientific Publications, str. 95–123.
- Regös J., Hitz H. R. 1974. Investigations on the mode of action of triclosan, a broad spectrum antimicrobial agent. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene-Erste Abt. Orig.-Reihe A (Medizinsche, Mikrobiologie und Parasitologie) **226** , 390–401.
- Šunjka D. 2012. Ostaci atrazina i njegovih degradacionih produkata u podzemnim vodama Srbije. Doktorski rad. Poljoprivredni fakultet

Univerziteta u Novom Sadu, Trg Dositeja  
Obradovića 8, Novi Sad.

Winogradsky S. 1938. On the morphology and ecology of *Azotobacter*. *Studies on the microbiology of soil and water. Ann. inst. Pasteur*, **60**: 351.

World Health Organization 1998. The most common topical antimicrobials Care of the umbilical cord. Retrieved 2007-10-08.

---

*Milica Moskovljević*

## Effects of Biocides and Atrazine on Bacterial Strains *Azotobacter* sp. Isolated from Soils near Petnica Science Center

*Azotobacter* sp. was isolated from soil from four sites near Petnica Science Center. Isolation was performed with the soil-plate enrichment method. *Azotobacter* sp. strains were treated with biocides (benzalkonium chloride, chlorhexidine gluconate, triclosan) and atrazine. Absorbance of the samples was measured at 600 nm 12 h after application. The relative growth of the bacterial cultures was estimated according to the change of absorbance. The sensitivity of bacterial cultures to all biocides tested in this study was noted. Cultures isolated from the soil with minimal antropogenic (agricultural) influence showed the greatest sensitivity to the agents used. Bacterial cultures were less sensitive to atrazine, compared to biocides. 